

**Leucine aminopeptidases produced recombinantly from Aspergillus soyae**Patent Number: ☐ [US6228632](#)Publication  
date: 2001-05-08Inventor(s): KHANH NGUYEN QUOC (DE); WOLF SABINE (DE); PLAINER HERMANN (DE);  
SCHUSTER ERWIN (DE); TITZE KORNELIA (DE); GOTTSCHALK MICHAEL (DE);  
SPROESSLER BRUNO (DE)

Applicant(s): ROEHM GMBH (US)

Requested  
Patent: ☐ [DE19526485](#)Application  
Number: US19980011540 19980420Priority Number  
(s): DE19951026485 19950720; WO1996EP01430 19960401IPC  
Classification: C12N9/48; C12N1/20; C12N1/14; C12N15/00; C07H21/04EC  
Classification: [C12N9/48](#)Equivalents: AU5398996, ☐ [AU708537](#), CA2226545, ☐ [EP0839200](#) (WO9704108),  
☐ [WO9704108](#)

---

**Abstract**

---

This invention relates to a recombinant deoxyribonucleic acid (DNA) which can be isolated from *Aspergillus soyae*, characterised in that it codes for a leucine aminopeptidase (LAP) and comprises a nucleotide sequence corresponding to the nucleotide sequence given in SEQ ID NO: 1 for the mature LAP or to a nucleotide sequence derived therefrom which hybridises under stringent conditions with the nucleotide sequence given in SEQ ID NO: 1 for the mature LAP. The invention further relates to vectors and transformed host organisms, and also relates to methods of producing LAP. Enzyme products for the production of protein hydrolysates, as well as protein hydrolysates which are produced correspondingly, also form part of the invention

---

Data supplied from the esp@cenet database - I2



①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 195 26 485 A 1**

⑳ Aktenzeichen: 195 26 485.1  
㉔ Anmeldetag: 20. 7. 95  
㉕ Offenlegungstag: 23. 1. 97

㉑ Int. Cl.<sup>8</sup>:  
**C 12 N 15/80**  
C 12 N 15/57  
C 12 N 1/15  
C 12 N 9/58  
C 12 N 9/62  
// (C12N 15/57, C12R  
1:66) (C12N 1/15,  
C12R 1:66) (C12N  
1/15, C12R  
1:885) A23J 3/34

DE 195 26 485 A 1

㉑ Anmelder:  
Röhm GmbH, 64293 Darmstadt, DE

㉒ Erfinder:  
Schuster, Erwin, Dr., 64625 Bensheim-Auerbach, DE;  
Sprößler, Bruno, Dr., 94380 Roßdorf, DE; Titze,  
Kornelia, 64367 Nieder-Ramstadt, DE; Gottschalk,  
Michael, Dr., 64372 Ober-Ramstadt, DE; Khanh,  
Nguyen Quoc, Dr., 64385 Reichelsheim, DE; Wolf,  
Sabine, Dr., 64853 Otzberg, DE; Plainer, Hermann,  
Dr., 64354 Reinheim, DE

㉓ Rekombinant hergestellte Leucinaminopeptidase aus *Aspergillus sojae*

㉔ Die Erfindung betrifft eine rekombinante Desoxyribonukleinsäure (DNA) isolierbar aus *Aspergillus sojae*, dadurch gekennzeichnet, daß sie für eine Leucin-Amino-peptidase (LAP) codiert und eine Nukleotidsequenz entsprechend der in SEQ ID NO:1 für die reife LAP angegebenen Nukleotidsequenz oder eine davon abgeleitete Nukleotidsequenz, die unter stringenten Bedingungen mit der in SEQ ID NO:1 für die reife LAP angegebenen Nukleotidsequenz hybridisiert, aufweist. Die Erfindung betrifft weiterhin Vektoren, transformierte Wirtsorganismen sowie Verfahren zur Herstellung von LAP, Enzymprodukte zur Herstellung von Proteinhydrolysaten sowie entsprechend hergestellte Proteinhydrolysate sind ebenfalls Bestandteile der Erfindung.

DE 195 26 485 A 1

## Beschreibung

## Gebiet der Erfindung

5 Die Erfindung betrifft eine rekombinante Desoxyribonukleinsäure (DNA) aus *Aspergillus sojae*, die für eine Leucin-Aminopeptidase (LAP) kodiert, Vektoren, die diese DNA sowie weitere DNA-Sequenzen zur Expression des LAP-Gens enthalten sowie mit diesen Vektoren transformierte filamentöse Pilze, die die rekombinante DNA exprimieren können. Weiterhin betrifft die Erfindung Enzym-Produkte, die eine mittels der rekombinan-  
 10 ten filamentösen Pilze hergestellte rekombinante LAP enthalten sowie Verfahren zur Herstellung von Proteinhydrolysaten mit geringem Gehalt an Bitterstoffen mittels der rekombinanten LAP.

## Stand der Technik

15 Enzymatisch erzeugte Proteinhydrolysate aus schwer verdaulichem oder schwer löslichem, tierischen oder pflanzlichen Einweiß, wie z. B. Gluten, Molke- oder Sojaproteinen, könnten in der Nahrungsmittelindustrie eine breite Anwendung z. B. als Zusätze für Aufschlagmassen, Babynahrung, Tierfutter, sowie allgemein für Fleisch- und Teigwaren finden.

Ein generelles Problem besteht darin, daß mit zunehmendem Hydrolysegrad der Einweiße Peptide entstehen, die einen unangenehmen bitteren Beigeschmack verursachen. Es sind schon zahlreiche Versuche unternommen worden, diesen bitteren Beigeschmack zu beseitigen. Keines der bisher entwickelten Verfahren konnte völlig befriedigen, so daß eine breite Anwendung bisher nicht stattfindet.

20 Nach neueren Erkenntnissen wird der Bittergeschmack durch einen Gehalt an Oligopeptiden verursacht, die bei fortschreitender Spaltung der nativen Proteine durch Endopeptidasen gebildet werden. Der Bittergeschmack tritt erst nach einem bestimmten Hydrolysegrad, bezogen auf die enthaltenen Peptidbindungen, auf. Dieser kritische Hydrolysegrad wird daher auch als Bitterpunkt bezeichnet. Der Bitterpunkt hängt stark vom hydrolysierten Protein ab. Ein Abbruch der Hydrolyse vor dem Erreichen des Bitterpunktes ist technisch schwer durchführbar und führt zudem dazu, daß die durch die Hydrolyse angestrebte bessere Verwertbarkeit nicht in vollem Umfang erreicht wird.

30 Die europäische Patentschrift EP 384 303 beschreibt ein Verfahren zur Herstellung von Proteinhydrolysaten mit niedrigem Gehalt an Bitterstoffen. Zur Hydrolyse werden eine Proteinase (Endopeptidase) und eine Amino-peptidase (Exopeptidase) aus einer *Aspergillus*-Kultur in einem ein- oder zweistufigen Verfahren verwendet. Als Quelle für das Peptidasegemisch werden toxikologisch unbedenkliche Stämme von *Aspergillus*-Arten wie z. B. *A. oryzae*, *A. niger* oder *A. sojae* genannt. Ein übermäßiges Entstehen von bitterschmeckenden Oligopeptiden wird dadurch vermieden, daß der Anteil an Endopeptidase gegenüber der Amino-peptidase begrenzt wird. Dies geschieht durch eine selektive thermische Inaktivierung der Endopeptidasen. Unter Anwendung des Verfahrens ist es möglich die Entstehung des Bitterpunktes zu verzögern und so vergleichsweise höhere Hydrolysegrade bei  
 35 niedrigem Gehalt an Bitterstoffen zu verwirklichen.

Durch das genannte Verfahren wird zwar eine Verbesserung erzielt, technisch wünschenswert wären jedoch  
 40 weit höhere Proteolysegrade ohne gleichzeitige Entstehung von Bitterpeptiden. Ein weiterer Nachteil liegt darin, daß die thermische Inaktivierung der Endopeptidasen und somit die nachfolgende Proteinhydrolyse nicht völlig reproduzierbar ist. Dies gilt umso mehr wenn im einstufigen Verfahren nur eine teilweise Endopeptidase-Inaktivierung angestrebt wird. Die schlechte Reproduzierbarkeit kann ein Überschreiten des Bitterpunktes oder eine nicht ausreichende Hydrolyse zur Folge haben. Weiterhin ist anzuführen, daß der Aufwand des vorzunehmenden Inaktivierungsschrittes zu einer nicht unwesentlichen Verteuerung des eingesetzten Enzyms und damit  
 45 des Verfahrens insgesamt beiträgt.

In den letzten Jahren sind eine Reihe von Genen für Pilzproteasen isoliert und exprimiert worden. WO 90100192 beschreibt die Isolierung des Gens für Aspergillopepsin A aus *A. awamori*. Beim Aspergillopepsin handelt es sich um eine Protease, die insbesondere bei der heterologen Genexpression in *A. awamori* zu einem proteolytischen Abbau des Fremdproteins führen kann. Bei der Expression des Kälber-Chymosins in *A. awamori*  
 50 besteht weiterhin das Problem, daß das Aspergillopepsin unerwünschte Fehlgeschmäcke bei der Käseherstellung hervorrufen kann. Die genannte Patentanmeldung hat daher die Inaktivierung des unerwünschten Gens zum Ziel.

Die japanische Patentanmeldung JP 90-269370 beschreibt die Isolierung des Gens für alkalische Protease (1) aus einer chromosomalen Genbank von *A. sojae*. Diese alkalische Protease findet im südostasiatischen Raum eine breite Anwendung bei der Herstellung von Sojasoße. Die Herstellung von Sojasoße ist jedoch nicht Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

## Aufgabe und Lösung

60 Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung war die Bereitstellung einer kostengünstigen Quelle für eine Endopeptidase für die Proteinhydrolyse, bei deren Verwendung die Entstehung des Bitterpunktes gegenüber dem jetzigen Stand der Technik nochmals weit verzögert wird, so daß die Prozeßsicherheit deutlich verbessert ist und zugleich die Kosten gesenkt werden. Die Aufgabe wird gelöst durch eine rekombinante Desoxyribonukleinsäure (DNA) isolierbar aus *Aspergillus sojae*, dadurch gekennzeichnet, daß sie für eine Leucin-Aminopeptidase (LAP)  
 65 (DNA) kodiert und eine Nukleotidsequenz entsprechend der in SEQ ID NO: 1 für die reife LAP angegebenen Nukleotidsequenz oder eine davon abgeleitete Nukleotidsequenz, die unter stringenten Bedingungen mit der in SEQ ID NO: 1 für die reife LAP angegebenen Nukleotidsequenz hybridisiert, aufweist.

Mittels dieser DNA können Vektoren, insbesondere Plasmide hergestellt werden mit denen *Aspergillus*-Stämme oder *Trichoderma reesei*-Stämme transformiert werden können. Aus den erhaltenen Transformanten können dann solche Stämme selektiert werden, die LAP in hohen Mengen exprimieren und sekretieren. Diese transformierten Wirtsorganismen erlauben wiederum Verfahren zur Herstellung der LAP in hohen Mengen. Aus den so gewonnenen Fermentationssäften können LAP-haltige Enzymprodukte hergestellt werden, die besonders gut zur Hydrolyse von Proteinen geeignet sind. Überraschenderweise wurde gefunden, daß eine Proteinhydrolyse mit den erfindungsgemäßen Enzymprodukten deutlich höhere Hydrolysegrade ohne Auftreten von Bittergeschmack ermöglicht als dies mit konventionell hergestellten Präparaten möglich ist.

Figuren, Sequenzbeschreibungen und Stammm hinterlegungen

Fig. 1: Darstellung des Vektors pKD12

Sequenzbeschreibungen:

SEQ ID NO: 1: Chromosomales LAP-Gen aus *A. sojae* RH3782 SEQ ID NO: 2: Proteinsequenz der LAP aus *A. sojae* RH3782 mit Signalpeptidsequenz.

Stammm hinterlegungen:

Folgende Mikroorganismen wurden bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen (DSMZ) gemäß den Bestimmungen des Budapester Vertrages hinterlegt:

*A. sojae* RH3782: Hinterlegungsnummer DSM 10090

*E. coli* DH5 $\alpha$  pKD12: Hinterlegungsnummer DSM 10089

*A. awamori* RH3827: Hinterlegungsnummer DSM 10091

Ausführung der Erfindung

Rekombinante DNA

Die Erfindung betrifft eine rekombinante Desoxyribonukleinsäure (DNA) isolierbar aus *Aspergillus sojae*, dadurch gekennzeichnet, daß sie für eine Leucin-Aminopeptidase (LAP) codiert und eine Nukleotidsequenz entsprechend der in SEQ ID NO: 1 für die reife LAP angegebenen Nukleotidsequenz oder eine davon abgeleiteten Nukleotidsequenz, die unter stringenten Bedingungen mit der in SEQ ID NO: 1 für die reife LAP angegebenen Nukleotidsequenz hybridisiert, aufweist.

Die Sequenzbeschreibung SEQ ID NO: 1 entspricht dem chromosomalen LAP-Gen aus *A. sojae* RH3782 mit 5'- und 3'-flankierenden Sequenzen. Unter der Nukleotidsequenz für die reife LAP wird die in SEQ ID NO: 1 enthaltene, für das Strukturgen der LAP ohne das Signalpeptid codierende DNA-Sequenz verstanden. Die Nukleotidsequenz für die reife LAP sind somit diejenigen Exon-Sequenzen, die für die Aminosäuren 1 (Tyr) bis 298 (Leu) codieren.

Die Erfindung betrifft weiterhin eine von der Nukleotidsequenz für die reife LAP abgeleitete Nukleotidsequenz. Darunter sind Nukleotidsequenzen zu verstehen, die von der in SEQ ID NO: 1 angegebenen Nukleotidsequenz abweichen, aber unter stringenten Bedingungen mit der DNA für die LAP hybridisieren.

Der Begriff "stringente Hybridisierungsbedingungen" ist dem Fachmann geläufig (Siehe z. B. Maniatis et al. (1982): Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York). Stringente Hybridisierungsbedingungen sind solche, unter denen nur DNA-Moleküle mit einem hohen Homologiegrad, z. B. > 85%, miteinander hybridisieren. Die Stringenz der Versuchsbedingungen kann z. B. durch die Hybridisierungstemperatur oder durch die Salzkonzentration der Hybridisierungslösung eingestellt werden.

Vom LAP Strukturgen abgeleitete DNA-Sequenzen können z. B. Abweichungen in der Nukleotidsequenz ohne Abweichungen in der Aminosäuresequenz, bedingt durch die Degeneration des genetischen Codes, aufweisen. Ebenso können geringfügige Abweichungen in der Nukleotidsequenz auch zu funktionell unwesentlichen Änderungen in der Aminosäuresequenz des Enzyms führen. Weitgehend homologe Gene die mittels der vorliegenden Erfindung aus anderen Stämmen von *A. sojae* oder nah verwandten *Aspergillus*-Arten isoliert werden können sind daher eingeschlossen. Von der Anspruchsdefinition sind auch Fusionsproteine eingeschlossen, die für die enzymatische Funktion des Proteins wesentliche Teile der Teile des LAP-Gens bzw. davon abgeleitete Nukleotidsequenzen aufweisen.

Die Sequenzbeschreibung SEQ ID NO: 1 enthält weiterhin die vor der Nukleotidsequenz für die reife LAP liegende, codierende Sequenz für das Signalpeptid, beginnend mit der Aminosäure -47 (Met) bis -1 (Thr). Vor der Signalpeptidsequenz (Nukleotid 1-581) liegt die funktionelle Promotorregion des LAP-Gens. Hinter dem Strukturgen befindet sich das TAA-Stopcodon sowie eine als Transkriptionsterminator funktionelle Region (Nukleotide 1742-1873). Die Sequenzbeschreibung SEQ ID NO: 2 gibt die gesamte Aminosäuresequenz der LAP mit dem Signalpeptid wieder.

Die erfindungsgemäße rekombinante DNA kann durch die Isolierung eines LAP-Gens aus einem *A. sojae*, z. B. aus *A. sojae* RH3782, erhalten werden. Dazu kann die LAP aus einem Kulturfiltrat des Stammes gereinigt werden. Dies ist ein kritischer Arbeitsschritt, da eine Reinigungsmethode zunächst entwickelt werden muß. Die LAP kann durch Ionenaustauschchromatographie und Gelfiltration von den übrigen Proteinen abgetrennt werden. Hier muß ein Reinheitsgrad erreicht werden, der eine eindeutige Sequenzierung des N-Terminus des Proteins oder von Peptiden daraus ermöglicht. Von den Proteinfragmenten lassen sich in an sich bekannter Weise durch Rückübersetzung des genetischen Codes DNA-Sonden ableiten. Derartige DNA-Sonden können nach Vorlage im Handel bestellt werden oder können mit Hilfe eines DNA-Synthesizers in bekannter Weise

selbst hergestellt werden.

Die beanspruchte DNA kann aus dem Genom eines LAP produzierenden *Aspergillus*-Stammes, insbesondere eines *A. sojae*-Stammes erhalten werden. Dazu wird RNA und/oder DNA aus dem Zellmaterial des *Aspergillus*-Stammes gewonnen. Daraus können mit Hilfe geeigneter Vektoren Copy DNA(cDNA)- und/oder genomische Genbanken angelegt werden. Für eine genomische Genbank kann z. B. der Phage  $\lambda$  EMBL3 als Vektor verwendet werden. Eine cDNA-Genbank kann z. B. in *E. coli* DH5 $\alpha$  mit dem Plasmid pUC 18 angelegt werden.

Es ist günstig für die Anlage der cDNA-Bank, das Ausgangszellmaterial in einem Medium anzuziehen, in dem der Stamm möglichst viel LAP produziert, da in diesem induzierten Zellmaterial der Gehalt an LAP-spezifischer mRNA höher als in nicht induziertem Zellmaterial ist. Dadurch kann ein höherer Anteil an LAP-spezifischen Klonen in der cDNA-Genbank erhalten werden. Geeignete Anzuchtmedien sind z. B. Minimalmedien für Pilze, denen eine proteinreiche Hauptstickstoffquelle, z. B. Milchkpulver oder Pepton, zugesetzt wird. Bei maximalem LAP-Titer im Medium kann die Zellernte vorteilhaft durch das Einfrieren des abfiltrierten Mycels in flüssigem Stickstoff erfolgen.

Aus dem Zellmaterial kann die Präparation von polyadenylierter mRNA in an sich bekannter Weise erfolgen. Dazu kann das Mycel z. B. in Gegenwart von Detergentien und RNase-Inhibitoren wie z. B. Heparin, Guanidinium-Isocyanat oder Mercaptoethanol, homogenisiert und die mRNA durch Phenol-, Phenol-Chloroform- ggf. mit Zusatz von Isoamylalkohol, Chloroform- und/oder Diäthylether-Extraktionen gewonnen werden. Optional können die Extraktionsmischungen zusätzlich Salze oder Puffer oder Kationen-chelierende Agenzien in bekannter Weise enthalten. Die mRNA kann anschließend aus der wäßrigen Phase durch Zusatz von Ethanol präzipitiert werden oder durch chromatographische Methoden, z. B. Affinitäts-Chromatographie an Oligo(dT)- oder Oligo(dU)-Sephadex, gewonnen werden. Ebenso kann eine Gradientenzentrifugation, z. B. in einem linearen Saccharosegradienten, oder eine Agarosegelchromatographie zur weiteren Reinigung der isolierten mRNA verwendet werden.

Aus der mRNA kann in an sich bekannter Weise mittels reverser Transkriptase (RNA abhängige DNA-Polymerase) zunächst eine komplementäre einzelsträngige DNA und dann eine doppelsträngige cDNA mit Hilfe einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase erzeugt werden. Dazu wird die mRNA mit einer Mischung von Desoxynucleosidtriphosphaten (dATP, dCTP, dGTP und dTTP), die optional radioaktiv markiert sind, um das Resultat der Reaktion nachvollziehen zu können, und einem Primer-Oligonukleotid, z. B. einem Oligo-dT-nukleotid, das mit dem Poly-A-Ende der mRNA hybridisiert, und einer reversen Transkriptase, z. B. der reversen Avian Myeloblastosis Virus (AMV) Transkriptase, inkubiert, die eine komplementäre einzelsträngige DNA erzeugt. In einem zweiten Schritt kann dann die einzelsträngige DNA z. B. mit der DNA-Polymerase 1 wiederum komplementär zu einer doppelsträngigen cDNA ergänzt werden. Die cDNA kann mit Hilfe von DNA-Linkern in einen Vektor, z. B. den Phagen  $\lambda$ gt10 inseriert werden.

Die erhaltenen Phagenklone können auf einem Agar mit *E. coli*-Wirtszellen vermehrt werden. DNA von diesen Agarplatten kann auf Nitrocellulose-Filter übertragen werden, welche mit einer z. B. radioaktiv markierten DNA-Sonde hybridisiert werden. Von den Nitrocellulosefiltern können dann Autoradiographien angefertigt werden aus denen die Position von Klonen, die das gesuchte LAP-Gen oder Teile davon enthalten auf den Agarplatten abgeleitet werden können. Auf diese Weise können entsprechende cDNA-Phagenklone aus der Genbank isoliert werden.

Genomische DNA kann unabhängig von den Anzuchtbedingungen der Zellen aus dem Mycel gewonnen werden. Bevorzugt ist eine Anzucht des Zellmaterials in einem Vollmedium für Pilze, z. B. Sabouraud-Bouillon. Die Isolierung der DNA aus dem Zellmaterial kann in an sich bekannter Weise durch Homogenisierung des Zellmaterials in einem Puffer, z. B. 100 mM Tris/HCl pH 8,0, und anschließende Phenol-, Phenol/Chloroform-Extraktion erfolgen. Die DNA kann durch Zusatz von Ethanol aus der wäßrigen Phase präzipitiert werden und ggf. weiter, z. B. durch CsCl-Dichtegradientenzentrifugation, gereinigt werden.

Die DNA kann dann partiell mit einem Restriktionsenzym, z. B. Sau3A, geschnitten werden und mit einem Vektor, z. B.  $\lambda$ EMBL3, ligiert werden. Die erhaltenen Phagenklone können auf einem Agar mit *E. coli*-Wirtszellen vermehrt werden. DNA von diesen Agarplatten kann auf Nitrocellulose-Filter übertragen werden, welche mit einer z. B. radioaktiv markierten DNA-Sonde hybridisiert werden. Von den Nitrocellulosefiltern können dann Autoradiographien angefertigt werden aus denen die Position von Klonen, die das gesuchte LAP-Gen oder Teile davon enthalten auf den Agarplatten abgeleitet werden können. Auf diese Weise können entsprechende Phagenklone aus der Genbank isoliert werden.

Diese DNA-Sonden können zum Screening in Genbanken verwendet werden. Günstig ist es zunächst eine aus der mRNA des Wirtsstammes hergestellte cDNA in einer cDNA-Genbank zu screenen. Mit Hilfe der spezifischen cDNA als Probe läßt sich dann auch das chromosomale Gen aus der genomischen Genbank auffinden. Nach dem Auffinden eines spezifischen Phagen-Klons, erfolgt üblicherweise eine Subklonierung in ein Plasmid, z. B. pBR322, pUC18 oder pUC19.

Die Charakterisierung der isolierten DNA erfolgt in an sich bekannter Weise durch Restriktionsanalyse und anschließende Sequenzierung, z. B. nach der Sanger-Methode. Durch den Vergleich der cDNA Sequenz mit der Sequenz des chromosomalen Gens kann die Lage der Exon- und Intronsequenzen bestimmt werden. Die Signalpeptidsequenz liegt zwischen dem ATG-Startcodon der kodierenden Sequenz und dem Beginn des reifen Proteins, das durch die Übereinstimmung mit der ermittelten N-terminalen Aminosäuresequenz bestimmt werden kann.

#### Vektoren zur Expression der LAP in *Aspergillus*- oder *T. reesei*-Stämmen

Die Erfindung betrifft einen Vektor enthaltend

- a) DNA-Sequenzen zur Replikation des Vektors in *E. coli*,
- b) DNA-Sequenzen zur Expression und Sekretion eines Polypeptids in einem *Aspergillus*-Stamm oder in einem *Trichoderma reesei*-Stamm, die für einen Promotor, eine Signalpeptidsequenz und optional für einen Terminator codieren,
- c) eine für ein Polypeptid codierende DNA-Sequenz, die funktionell mit den DNA-Sequenzen nach b) verbunden ist,

dadurch gekennzeichnet, daß

die DNA-Sequenz nach c) eine Nukleotidsequenz entsprechend der in SEQ ID NO:1 für die reife LAP angegebenen Nukleotidsequenz oder eine davon abgeleitete Nukleotidsequenz, die unter stringenten Bedingungen mit der in SEQ ID NO: 1 für die reife LAP angegebenen Nukleotidsequenz hybridisiert, aufweist.

Die DNA-Sequenzen nach a) werden benötigt, um die Vektor-DNA in *E. coli*, z. B. *E. coli* DH5 $\alpha$ , vermehren zu können. Eine derartige DNA-Sequenz kann ein Phage, z. B. der Phage  $\lambda$ EMBL3, ein Cosmid oder bevorzugterweise ein Plasmid sein. Geeignete Plasmide sind z. B. pBR322, pUC18 oder pUC19 oder ggf. Fragmente dieser Plasmide, die zumindest den "origin of replication" und einen Selektionsmarker für *E. coli* enthalten.

Die Vektoren enthalten weiterhin DNA-Sequenzen nach b), die in *Aspergillus*-Stämmen oder in *T. reesei*-Stämmen zur Expression und Sekretion des Gens des LAP-Gens nach c) führen. Diese DNA-Sequenzen nach b) sind mit dem LAP-Gen funktionell verbunden. Dies sind z. B. 5'- und 3'-flankierende Sequenzen wie 5' vor dem Gen angeordnete Promotoren, eine Signalpeptidsequenz, 3' hinter dem Gen angeordnete Terminatoren. Weitere funktionelle DNA-Sequenzen, die vorhanden sein können sind z. B. Ribosomenbindungsstellen für die Translation, Enhancer oder "Upstream Activating Sequences" oder Polyadenylierungsfunktionen.

Signalpeptidsequenzen sind 5' unmittelbar vor dem Strukturgen liegende, für Aminosäuren codierende DNA-Sequenzen, die bei extrazellulären Proteinen vorkommen und gemeinsam mit dem Strukturgen transkribiert und translatiert werden. Bei der Sekretion des Proteins aus der Zelle werden die Signalpeptidsequenzen abgespalten wodurch das eigentliche "reife" Protein entsteht. Ein Signalpeptidsequenz ist somit notwendig um die Sekretion der LAP aus der Wirtszelle zu erreichen. Ebenso sind ein Promotor und ein Terminator zur Initiation der Translation bzw. zur Termination der Transkription des Gens notwendig.

Es kann sich dabei um den natürlich im Chromosom von *A. sojae* liegenden Promotor, die Signalpeptidsequenz und/oder den Terminator des LAP-Gens handeln. Ebenso können die funktionellen DNA-Sequenzen von anderen Genen stammen, die in Pilzstämmen der Gattung *Aspergillus* oder in *T. reesei* exprimiert und sekretiert werden.

Beispiele für Gene die geeignete funktionelle DNA-Sequenzen aufweisen sind z. B. das TAKA-Amylase A Gen aus *A. oryzae* (EP 238 023), das Pektinesterase-Gen oder das Polygalakturonidase-Gen aus *A. niger* (EP 388 593), das Glucoamylase-Gen aus *A. awamori* (EP 215 594) das Cellobiohydrolase-Gen I (cbh 1) aus *T. reesei* (EP 244234).

Die DNA-Sequenz nach c) enthält das LAP-Strukturgen oder eine davon abgeleitete DNA-Sequenz. Diese DNA-Sequenz kann z. B. in Form eines chromosomalen Gens mit den natürlich enthaltenen Introns oder als von der Messenger Ribonukleinsäure (mRNA) abgeleitete cDNA ohne Introns enthalten sein.

Ein erfindungsgemäßer Vektor ist z. B. das Plasmid pKD12 (siehe Fig. 1). Das Plasmid besteht aus dem allgemein bekannten *E. coli* Plasmid pUC19 sowie einem Hind/III/EcoRI-Restriktionsfragment aus der chromosomalen DNA von *A. sojae* RH3782. Das Hind/III/EcoRI-Restriktionsfragment enthält das Strukturgen der LAP mit der natürlichen, für das Signalpeptid kodierenden DNA-Sequenz sowie den natürlichen, 5' vor dem Gen liegenden Promotor und 3' hinter dem Gen liegenden Terminationssequenzen. Die vor und hinter dem Strukturgen einschließlich der Signalpeptidsequenz liegenden DNA-Sequenzen sind funktionell und führen zur Expression und Sekretion in filamentösen Pilzen der Gattung *Aspergillus*, z. B. in Stämmen von *A. sojae* oder *A. oryzae*.

Dem Fachmann sind hinreichend Methoden bekannt, mit deren Hilfe ein Gen mit funktionellen DNA Sequenzen, z. B. einem anderen Promotor oder einer Signalpeptidsequenz, in einem Vektor kombiniert werden kann (Siehe z. B. Maniatis et al. (1982): Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York). Die Nukleotidsequenz für das reife LAP Gen oder eine davon abgeleitete Nukleotidsequenz kann daher auch mit anderen funktionellen Sequenzen als den in pKD12 vorhandenen funktionellen DNA-Sequenzen verbunden werden, die zur Expression und Sekretion der LAP in einem filamentösen Pilz der Gattung *Aspergillus* oder in *T. reesei* geeignet sind.

Von besonderer Bedeutung in Bezug auf die Höhe der Expression sind vor allem funktionelle Promotorsequenzen. Hierbei handelt es sich um DNA-Sequenzen von ca. 500–2000 Basenpaaren Länge, die jeweils 5' vor dem Startcodon eines *Aspergillus*- oder eines *T. reesei*-Gens liegen.

Solche DNA-Sequenzen können z. B. als Restriktionsfragmente isoliert werden und mit Restriktionsfragmenten des LAP-Gens einschließlich der Signalpeptidsequenz ligiert werden. Dabei können nicht kompatible Restriktionsschnittstellen oder Bereiche ohne geeignete Restriktionsschnittstellen z. B. durch synthetisch hergestellte Oligonukleotide überbrückt bzw. ersetzt werden, so daß die ursprüngliche DNA-Sequenz erhalten bleibt. Auf diese Weise kann die DNA-Sequenz des LAP-Gens einschließlich des Signalpeptids unverändert erhalten bleiben und mit einer ebenfalls unveränderten Promotorsequenz funktionell verbunden werden.

Zur Erhöhung der Expression kann der natürliche Promotor gegen einen anderen ausgetauscht werden. Es sind zahlreiche geeignete Promotoren bekannt. Geeignet ist z. B. der TAKA-Amylase Promotor aus *A. oryzae* (siehe EP 238 023) zur Expression in *A. oryzae*- oder *A. sojae*-Stämmen, der *gpdA*-Promotor aus *A. nidulans* (PUNT et al. (1987) Gene 56, S. 117–124) zur Expression in *A. nidulans*-, *A. niger*-, *A. phoenicis*-, *A. japonicus*-, *A. foetidus* oder *A. awamori*-Stämmen. Geeignet für die Expression in einem *T. reesei*-Stamm ist z. B. der *cbh1*-Promotor aus *T. reesei* (EP-A-244234).

Als Terminator wird die natürliche hinter dem Strukturgen liegende chromosomale Terminator-Sequenz

gemäß SEQ. ID NO: 1 bevorzugt. Je nach dem zur Expression verwendeten Stamm oder der verwendeten Promotorsequenz kann es von Vorteil sein zusätzlich die natürliche Leadersequenz oder auch die Terminationssequenz auszutauschen, um eine nochmals verbesserte Expression und Sekretion zu erreichen.

Geeignet ist z. B. der trpC Terminator aus *A. nidulans* (PUNT et al., s. o.) oder der Pektinesterase-Terminator aus *A. niger* (EP 388 593).

#### Transformierte Aspergillus- oder Trichoderma-Stämme zur großtechnischen Produktion von LAP

Die erfindungsgemäßen Plasmide können bei der Transformation von Aspergillus- oder Trichoderma reesei-Stämmen verwendet werden. Die Plasmide können dabei mehrfach ins Genom der Wirtsstämme integriert werden. Durch die Erhöhung der Anzahl der Genkopien und/oder die zusätzliche Verwendung stärkerer Promotoren kann die LAP-Produktivität bedeutend erhöht werden. Aus einer Vielzahl von Transformanten können solche mit besonders hoher Produktivität ausgewählt werden. Durch die Förderung der LAP-Produktivität treten zugleich Nebenaktivitäten, wie eine unerwünschte Endoproteinase-Aktivität, in den Hintergrund. Erfindungsgemäß transformierte Stämme eignen sich daher besonders gut zur großtechnischen Produktion von LAP-Enzymprodukten.

Besonders geeignet zur Expression und Sekretion der LAP sind Pilz-Stämme von Arten, deren gute Produktionseigenschaften für Enzyme bekannt sind. Bevorzugt sind insbesondere Stämme der Arten *A. niger*, *A. awamori*, *A. phoenicis*, *A. japonicus*, *A. foetidus*, *A. oryzae* oder *A. sojae*, sowie *T. reesei*. Geeignete Stämme können aus öffentlich zugänglichen Stammsammlungen wie z. B. ATCC, DSM, CBS oder NRRL erhalten werden. Geeignete Wirtsstämme sind z. B. *A. awamori* ATCC 11360, *A. foetidus* ATCC 10254 und ATCC 1035, *A. japonicus* 16873, *A. oryzae* NRRL 695, *A. niger* ATCC 10864, *A. phoenicis* CBS 136.52 sowie *T. reesei* ATCC 26921. Besonders geeignet ist *A. awamori* NRRL 3112. Ebenfalls besonders geeignet ist der Gendonorstamm *A. sojae* RH3782 (hinterlegt bei DSM).

Die Transformation der Pilzstämme kann mit Hilfe bekannter Methoden vorgenommen werden. EP 184438 (US 4 885249) beschreibt z. B. eine Transformationsmethode für *A. niger*, bei der als Selektionsmarker das argB-Gen aus *A. nidulans* verwendet wird. EP 238 023 beschreibt im Beispiel 9 eine generell anwendbare Transformationsmethode für *A. oryzae*-Stämme. Dabei wird das Plasmid p3SR2 mit dem amdS-Gen aus *A. nidulans* als Selektionsmarker verwendet. EP 244234 beschreibt die Transformation von *T. reesei* mit diesem Vektor. Die Transformation von *A. niger* mit p3SR2 wird von KELLY und HYNES (1985), EMBO Journal 4, S. 475—479, beschrieben. Für Stämme der Arten *A. niger*, *A. awamori*, *A. japonicus*, *A. phoenicis* und *A. foetidus* kann bevorzugt der Vektor pAN7-1 (PUNT et al. (1987) Gene 56, S. 117—124) verwendet werden. Transformanten können dann anhand der Resistenz gegen Hygromycin B selektiert werden.

Zur Transformation werden zunächst aus vegetativen Zellen oder auch aus Konidiosporen unter Enzymeinwirkung Protoplasten in einem osmotisch stabilisiertem Medium erzeugt. Zu diesen werden üblicherweise nach mehreren Waschschritten die zu transformierende Plasmid-DNA in Gegenwart von Polyethylenglykol (PEG) und  $\text{CaCl}_2$  zugegeben, was zur Aufnahme der DNA in die Zellen führt. Nach der Transformation werden die Protoplasten auf osmotisch stabilisiertem Medium regeneriert, wobei eine Selektion auf solche Zellen erfolgt die ein Markergen aufgenommen haben.

Die Transformation der Pilzstämme erfolgt bevorzugt nach dem Co-Transformationsverfahren bei dem ein Plasmid mit einem Selektionsmarker für Aspergillus- oder *T. reesei*-Stämme und ein erfindungsgemäßer Vektor — eine Phagen-DNA oder eine Cosmid-DNA oder bevorzugt ein Plasmid mit dem LAP-Gen — gleichzeitig zu den zu transformierenden Zellen zugegeben werden.

*A. awamori* NRRL 3112 kann beispielsweise mit den Plasmiden pAN7-1 und pKD12 cotransformiert werden. Es können dann gegen Hygromycin B resistente Transformanten selektiert werden, die in Schüttelkolben auf die Produktion von LAP geprüft werden können. Eine Beispiel für eine auf diese Weise erhaltene, LAP-exprimierende Transformante von *A. awamori* NRRL 3112 ist der Stamm *A. awamori* RH3827, der bei DSM hinterlegt wurde (siehe oben unter Stammhinterlegungen).

Gut geeignet ist z. B. das amdS-Gen aus *A. nidulans*, das z. B. auf dem Vektor p3SR2 vorhanden ist. Mit diesem Plasmid transformierte Aspergillus oder Trichoderma-Stämme, die vorher schlecht auf einem Minimalnährboden mit dem künstlichen Substrat Acetamid als alleiniger Stickstoffquelle wuchsen, können nach der Transformation mittels eines deutlichen Wachstumsvorteils selektiert werden. Unter den insgesamt erhaltenen Transformanten müssen dann solche mit erhöhter oder besonders hoher LAP-Produktivität ausgewählt werden. Diese Auswahl kann z. B. aufgrund der LAP-Produktivität der Transformanten in Schüttelkolben getroffen werden.

#### Verfahren zur Herstellung von LAP mit einem erfindungsgemäß transformierten Wirtsorganismus

Der transformierte Wirtstamm kann in einem geeigneten Medium in Submerskultur inkubiert werden. Geeignete Medien sind solche in denen filamentöse Pilze ein gutes Wachstum zeigen, insbesondere solche in denen zugleich eine gute Bildung der LAP erfolgt. Gut geeignet sind Medien von denen bekannt ist, daß der jeweilige Aspergillus- oder *T. reesei*-Wirtstamm ein gutes Wachstum zeigt und zugleich LAP bildet. Besonders günstig auch im Hinblick auf kostengünstige Medien ist die Verwendung billiger Naturprodukte als Nährbodenbestandteile, wie z. B. Maisquellpulver oder Maisquellwasser, Roggenkleie, Weizenkleie, Kartoffeldextrin, Maltodextrin, Kartoffelprotein, Melasse etc. Günstig ist ebenfalls die Verwendung von Ammoniumsalzen als N-Quellen, z. B. Ammoniumsulfat. Der Fachmann kann sich an für die Fermentation von Aspergillus- oder Trichoderma reesei-Stämmen bekannten Medien orientieren und durch Versuche besonders geeignete Medien herausfinden. Ein geeignetes Medium kann z. B. 5% Maltodextrin und 5% Weizenkleie in Leitungswasser enthalten.

Die Herstellung der LAP kann durch Submersfermentation erfolgen. Die Beimpfung kann dabei üblicherwei-

se über eine Impfkaskade vom Kulturröhrchen oder einer Petrischalenkultur über Schüttelkolben ggf. einen oder mehrere Vorfermenter in einen Hauptfermenter erfolgen. Eine übliche Fermentationsdauer beträgt ca. 30 bis 70 Stunden bei ca. 28° Celsius unter aeroben Bedingungen. Nach Abbruch der Fermentation wird das Zellmaterial, z. B. durch Filtration, abgetrennt und der LAP-haltige Kultursaft geerntet. Der Kultursaft kann zu flüssigen oder trockenen LAP-Produkten, z. B. durch Sprühtrocknung oder Sprühgranulation, weiterverarbeitet werden. Auf diese Weise können LAP-Enzymprodukte hergestellt werden, die zur Hydrolyse von Proteinen geeignet sind.

#### Proteinhydrolyse unter Verwendung eines erfindungsgemäßen LAP-Enzymproduktes

Die erfindungsgemäß auf rekombinantem Wege hergestellte LAP eignet sich hervorragend zur Hydrolyse von zahlreichen tierischen oder pflanzlichen Einweißstoffen zu wertvollen Proteinhydrolysaten, die geschmacksneutral oder wohlschmeckend und im wesentlichen frei von Bittergeschmack sind. Beispiele hydrolysierbarer Proteine sind Soja-Protein, Gluten, Getreide- und Bohnenproteine, Kartoffelprotein, Hefeprotein und andere mikrobielle Proteine, Hämoglobin und Fleisch- und Fischproteinmaterial. Vorzugsweise wird das Verfahren für die Hydrolyse von Milchproteinen, insbesondere Casein und Molkenprotein eingesetzt.

Die Hydrolyse wird am besten im Temperaturbereich von 10 bis 60°C, vorzugsweise von 25 bis 45°C, in 1 bis 10 Stunden unter Rühren durchgeführt. Zweckmäßig werden die Ausgangsproteine in einer Aufschlämmung oder Lösung mit einem Festgehalt von 5 bis 15 Gew.-% eingesetzt. Der pH-Wert liegt im allgemeinen im Bereich von 5 bis 9,5, vorzugsweise bei 6 bis 8.

Das Verfahren kann ein- oder zweistufig ausgeführt werden. Vorzugsweise wird das Verfahren einstufig durchgeführt indem man eine handelsübliche Endo-Proteinase in geringer Konzentration und die LAP gleichzeitig einwirken läßt. Zweckmäßig sind pro 100 g zu hydrolysierendem Protein 0,01 bis 10 Ansonseinheiten Endo-Proteinase und 10<sup>5</sup> bis 10<sup>7</sup> Einheiten an LAP. Dabei können unter Verwendung der rekombinanten LAP wesentlich höhere Hydrolysegrade ohne die Entstehung von Bitterpeptiden erzielt werden als dies etwa mit der in EP 384 303 beschriebenen konventionellen LAP möglich ist.

Wenn der erwünschte Hydrolysegrad erreicht ist, werden die Endo-Proteinase und die LAP inaktiviert, zweckmäßig durch kurzzeitiges Erhitzen auf ca. 100°C. Alternativ ist es auch möglich eine Inaktivierung durch Ansäuerung auf pH 3—4 zu erreichen. Ggf. kann auch eine Kombination beider Methoden angewendet werden. Das Proteinhydrolysat kann in gewünschter Weise zu Nahrungs- oder Futtermitteln verarbeitet werden. Es kann z. B. in flüssiger Form oder nach Sprüh- oder Walzentrocknung weiterverarbeitet werden.

#### Beispiele

(Prozentangaben in den Beispielen bedeuten Gew.-% soweit nicht anders angegeben)

##### Beispiel 1

##### Reinigung der LAP aus A. sojae

100 ml Kulturfiltrat von A. sojae RH3782 wurden mit destilliertem H<sub>2</sub>O auf 1000 ml aufgefüllt und anschließend durch Zentrifugation für 5 min bei 5000 g und 25° Celsius geklärt. Um die elektrische Leitfähigkeit herabzusetzen wurde die Probe über eine Sephadex G25-Säule (MERCK) entsalzt. Die aufgefangene Enzymlösung hatte eine Leitfähigkeit von 3 mS/cm.

Im einem weiteren Schritt wurde eine Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Fractogel (MERCK) vorgenommen. Dazu wurden 1000 ml der entsalzten Enzymlösung mit 1000 ml Puffer A (10 mM Tris/HCl pH 7,6, 10 mM Ca-Acetat) versetzt und in mehreren Ansätzen auf eine DEAE-Fractogel-Säule (Höhe 235 mm, Durchmesser 50 mm) aufgetragen. Die Säule wurde mit Puffer A gespült. Die Elution erfolgte in einem kontinuierlichen Gradienten von Puffer A zu Puffer B (Puffer A + 1 M NaCl). Es wurde bei einer Elutionsgeschwindigkeit von 4 ml 1 min eluiert und Fraktionen zu je 20 ml aufgefangen.

Die Fraktionen wurden auf Anwesenheit der LAP getestet. Dies geschah durch Messung der LAP-Aktivität. Eine LAP-Einheit ist danach definiert als die Enzymmenge, die in einer 0,0016 molaren wäßrigen Lösung von L-Leucin-p-nitroanilid bei pH 7,0 und 30°C eine Hydrolysegeschwindigkeit von 1 Mikromol pro Minute bewirkt.

Die Messung der LAP-Aktivität wurde wie folgt ausgeführt. 0,3 ml Enzymlösung wurden zu 4 ml bei 30°C vortemperierter Substratlösung (0,0016 M L-Leucin-p-nitroanilid; 0,021 g L-Leucin-p-nitroanilid (Novabiochem Best.-Nr. 03-32-0045) wurden in 2 ml Dimethylsulfoxid p.a. (Merck) gelöst und mit 0,05 M Tris/HCl pH 7,0 auf 50 ml aufgefüllt) in einer 1 cm dicken Meßküvette gegeben.

Die Extinktion bei 405 nm wurde nach 10 min bei 30 Grad Celsius im Vergleich zur Substratlösung ohne Enzym als  $\Delta E_{405nm}$  im Photometer bestimmt. Die Enzymlösung wurde dazu mit 0,05 M Tris/HCl pH 7,0 so verdünnt, daß Extinktionswerte im Bereich von 0,3 bis 0,7 erhalten wurden. Der Gehalt an LAP wurde nach folgender Formel errechnet.

$$LAP - Units = \frac{\Delta E_{405nm} \cdot Analyservolumen (ml) \cdot 10^6}{9620 \cdot Volumen Enzymlösung (ml) \cdot Enzymkonz. \cdot t_{min} \cdot d}$$

9620 = molarer Extinktionskoeffizient für Leucin-p-Nitroanilid



Analysenvolumen = 4,3 ml  
 Volumen Enzymlösung = 0,3 ml  
 Enzymkonzentration = Verdünnungsfaktor der Enzymlösung  
 $t_{\min} = 10 \text{ min}$   
 d (Schichtdicke der Meßküvette) = 1 cm

Die Elution der LAP setzte bei ca. 0,1 M NaCl ein. Die LAP-haltigen Fraktionen aus mehreren Läufen wurden vereinigt, gegen  $\text{H}_2\text{O}$  dest. dialysiert und anschließend lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde in 90 ml Puffer A aufgenommen. Im nächsten Schritt wurden die Proben in mehreren Ansätzen auf eine Mono Q (Pharmacia) — Anionenaustausch-Chromatographie-Säule aufgetragen und wiederum in einem kontinuierlichem Gradienten von Puffer A zu Puffer B eluiert. Die Hauptmenge an LPA eluierte dabei zwischen 120 und 180 ml NaCl. Das Eluat, 1888 ml, wurde gegen  $\text{H}_2\text{O}$  dest. dialysiert und anschließend lyophilisiert.

Das Lyophilisat wurde in 52 ml Puffer A aufgenommen und in 4 Läufen a 13 ml über eine Sephacryl S-200 HR (Pharmacia) — Säule durch Gelchromatographie weiter gereinigt. Die LAP-haltigen Fraktionen wurden vereinigt. Die spezifische Aktivität der gereinigten Fraktionen lag bei ca. 55.000 LAP Units/mg Protein. Das gereinigte Protein zeigt in der SDS-Gelelektrophorese eine einheitliche Bande mit einem Molekulargewicht von ca. 37.000 Dalton. Der isoelektrische Punkt liegt bei ca. pH 4,4. Das auf diese Weise gereinigte Protein wurde zur Sequenzierung verwendet.

#### Beispiel 2

##### Sequenzierung der LAP aus *A. sojae*

Die N-terminale Aminosäure-Sequenz des gereinigten Proteins wurde unter Verwendung eines Gasphasensequenators (Applied Biosystems Model 470A) bestimmt. Die bestimmte Sequenz lautete:

N-Tyr-Pro-Asp-Ser-Val-Gln-His-Xaa-Glu-Thr-Val-Gln-Asn-Leu-Ile-Asn-Ser-Leu-Asp-Lys-Lys-Asn-Phe-Glu-Thr-Val-Leu-Gln-Pro-Ile-Ser-Glu-Phe-His-Asn-Arg-COOH.

Weiterhin wurde das gereinigte Enzym mittels Trypsin gespalten und die erhaltenen Peptide mittels Gelchromatographie getrennt und ebenfalls sequenziert. Eines dieser tryptischen Peptide wurde als T15 bezeichnet und diente später für die Ableitung eines Oligonukleotids. Die von T15 erhaltene Aminosäuresequenz lautete:

N-Thr-Ile-Val-Leu-Gly-Ala-His-Gln-Asp-Ser-Ile-Asn-Leu-Asn-COOH.

#### Beispiel 3

##### Ableitung und Synthese einer DNA-Sonde

Aus der N-terminalen Aminosäuresequenz wurde eine Teilsequenz für die Ableitung der Oligonukleotid-DNA-Sonde KD5 zugrunde gelegt, wobei die aus EP 388 593 bekannte Codon-Usage des Pektinesterase-Gens aus *A. niger* genutzt wurde. Dabei wurde das 5'-Ende so geändert, daß eine Sall-Restriktionsenzymstichstelle erhalten wurde. Die Teilsequenz aus der N-terminalen Aminosäuresequenz lautet:

N-Thr-Val-Leu-Gln-Pro-Ile-Ser-Glu-Phe-His-Asn-COOH.

Die Sequenz der abgeleiteten DNA-Sonde KD5 lautet (Die Position der Sall-Schnittstelle ist unterstrichen):

5'-CGC GTCGACA GTA CTT CAG CCC ATC TCG GAG TTC CAAAA-3'.

Eine Teilsequenz aus dem tryptischen Peptid T15 diente als Vorlage für die DNA-Sonde KD4. Die Teilsequenz lautet:

N-Leu-Gly-Ala-His-Gln-Asp-Ser-Ile-Asn-COOH.

Die Sequenz der DNA-Sonde KD4 lautet:

5'-CTC GGC GCG CAC CAG GAC TCC ATC AA-3'.

Die Synthese der DNA-Sonden erfolgte nach dem Phosphoramiditverfahren nach Beaucage, S. L. und Caruthers, M. H. (1981) Tetrahedron Letters 22, S. 1859—1862, mittels eines DNA-Synthesizers (Applied Biosystems 380 A).

#### Beispiel 4

##### Herstellung von induziertem Zellmaterial zur Isolierung von RNA

Ausgehend von zwei Petrischalen mit 14 Tage alten Kulturen von *A. sojae* RH3782 auf Kartoffel-Glucose-Agar (MERCK) wurde eine Sporensuspension in ca. 20 ml destilliertem Wasser mit 0,85% NaCl und 0,1% Tween® hergestellt. Erlenmeyerkolben mit 1 Liter Volumen und zwei Schikanen, befüllt 100 ml LAP-Medium wurden mit je 1 ml Sporensuspension beimpft. Die Kolben wurden für 120 Stunden bei 28° Celsius unter Schütteln bei 150 Umdrehungen pro Minute inkubiert.

LAP-Medium:

4% Maisschrot

2%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$

2% Milchhefe (Otto Aldag)

1,4%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

0,12%  $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$   
0,05%  $\text{CaCl}_2$

Der pH-Wert wird auf 7,0 eingestellt. Die Sterilisation erfolgt 15 Minuten bei 121°C im Autoklaven.

Anschließend wurde das Mycel durch Filtration über sterile Nylonfilter abgetrennt und kurz zwischen Papiertüchern mit leichtem Druck gepreßt, um überschüssiges Medium zu entfernen. Das Mycel aus je zwei bis vier Schüttelkolben wurde dann portionsweise in kleine Plastikbeutel gefüllt, die sofort in flüssigen Stickstoff überführt wurden. Das tiefgefrorene Mycel wurde bis zur Weiterverwendung bei -80°C gelagert. Der Kulturüberstand wurde auf LAP-Aktivität analysiert und enthielt 686 LAP Units/g.

#### Beispiel 5

#### Präparation von RNA aus den induzierten Zellen aus Beispiel 5

Für die Isolierung der RNA wurde die Methode nach Vierula P. J. und Kapoor, M. (1989) J. Biol. Chem. 264, S. 1108—1114 verwendet.

#### Beispiel 6

#### Herstellung von Zellmaterial zur Isolierung von DNA

Die Herstellung von Zellmaterial zur Präparation von DNA erfolgte analog zum Beispiel 5 mit dem Unterschied, daß statt LAP-Medium Sabouraud-Bouillon (MERCK) als Medium verwendet wurde. In diesem Medium wurde ein dichteres Wachstum erhalten (Der Kulturüberstand enthielt 208 LAP-Units).

#### Beispiel 7

#### Synthese von cDNA und Isolierung eines LAP-spezifischen cDNA-Klons

Die Synthese von cDNA wurde die Methode von Russo et al. (1991) EMBO J. 10, S. 563—571, verwendet. Das Prinzip des Verfahrens beruht darauf, mittels eines Oligo(dT)-Primers, EA13, die polyadenylierte mRNA in einzelsträngige cDNA umzuschreiben. An diese cDNA-Synthese schließt sich eine Polymerase-Chain-Reaktion (PCR) an. Diese wurde mittels der genspezifischen Oligonukleotid-DNA-Sonde KD5 gestartet. Die Rückreaktion erfolgt mittels des Primers EA14, der eine Teilsequenz des Oligo(dT)-Primers EA13 aufweist. Die Sequenzen von EA13 bzw. EA14 lauten (Restriktionsschnittstellen für die Enzyme XhoI und SalI enthaltende Bereiche sind unterstrichen):

EA13: 5'-GAC TCG AGT CGA CAT CGA(T)<sub>21</sub>A/C/G-3'

EA14: 5'-GAC TCG AGT CGA CAT CGA TT-3.

#### Bedingungen für die Synthese der einzelsträngigen cDNA

10 µg RNA wurden in einem Reaktionsvolumen von 50 µl in 50 mM Tris/HCl pH 8,3, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 75 mM KCl, 5 mM DTT, 0,4 mM Desoxy-Nukleosidtriphosphate (0,4 mM dATP, 0,4 mM dCTP, 0,4 mM dGTP und 0,4 mM dTTP), mit 30 pmol EA13 und 200 Units M-MLV Reverse Transkriptase (Gibco-BRL) versetzt. Die Inkubationsdauer betrug 45 min bei 42°C.

#### Versuchsbedingungen für die PCR-Reaktion

Das Reaktionsvolumen betrug 100 µl. Die Reaktion wurde in 20 mM Tris/HCl pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,2 mM Desoxy-Nukleosidtriphosphate (0,2 mM dATP, 0,2 mM dCTP, 0,2 mM dGTP und 0,2 mM dTTP), mit 70 pmol KD5 und 5 Units Taq-DNA-Polymerase ausgeführt. Der Ansatz wurde für 20 PCR-Zyklen (94°C, 40 sec — 50°C, 2 min — 72°C, 3 min pro Zyklus) inkubiert.

Anschließend wurden die PCR-Produkte gelelektrophoretisch aufgetrennt. Es wurde im Bereich von 1 kb eine Bande erhalten, die mit der Oligonukleotidsonde KD4 hybridisierte. Der PCR-Ansatz wurde mit Ethanol gefällt, mit SalI geschnitten und mit SalI geschnittenes Plasmid pUC18 ligiert. Die Plasmide wurden in E. coli DH5α transformiert. Nach dem Plattieren des Reaktionsansatzes wurden 131 weiße Kolonien erhalten (im Gegensatz zu blauen Kolonien mit Plasmiden ohne Insertionen), von denen mittels Koloniehybridisierung mit der radioaktiv markierten Oligonukleotidsonde KD4 der Klon T128 ausgewählt wurde, der ein Plasmid mit einer Insertion von 1 kb aufwies. Dieses Plasmid wurde als pKD4 bezeichnet. Die Insertion wurde sequenziert. Die von der DNA abgeleitete Aminosäuresequenz enthielt, wie erwartet, die bei der Proteinsequenzierung der LAP gefundenen Peptidsequenzen. Die Sequenz ist unter SEQ ID NO. 1 aufgeführt.

#### Beispiel 8

#### Isolierung des chromosomalen LAP-Gens

Chromosomale DNA aus A. sojæ wurde mittels Phenolextraktion aus dem Zellmaterial aus Beispiel 7 isoliert und partiell mit dem Restriktionsenzym Sau3A gespalten. Die DNA wurde mittels einer Saccharose-Gradienten-

ten-Zentrifugation nach Größe fraktioniert. DNA aus Fraktionen mit Fragmenten, die größer als 10 kb waren wurden in den Phagen Lambda EMBL3 kloniert. Es wurden ca. 250 000 rekombinante Phagen erhalten, die auf großen Agar-Platten (Nunc-Schalen) mit je ca. 15 000 Plaque bildenden Einheiten pro Platte verteilt wurden. Von den Platten wurde die DNA der Phagen auf entsprechende Nitrocellulose-Filter für die Hybridisierung übertragen. Als Probe zu Detektierung von Phagen, die das chromosomale LAP-Gen enthalten wurde das Sall cDNA-Fragment aus dem Plasmid pKD4 (siehe Beispiel 8) verwendet. Es wurde isoliert und radioaktiv markiert. Die Nitrocellulose-Filter wurden mit der markierten Probe für 18 h bei 65°C hybridisiert. Anschließend wurden die Filter bei 65°C mit zweifach SSC-Puffer mit 0,1% SDS gewaschen. Mittels Autoradiographie wurden zwei positive Klone detektiert, von den Platten mit den rekombinanten Phagen isoliert. Die Klone wurden nochmals plattiert und im gleichen Verfahren rehybridisiert. Von einem der Klone erfolgte eine Subklonierung eines hybridisierenden, 1,8 kb großen Hind/III/BamHI-Fragmentes in das Plasmid pUC18. Das erhaltene Plasmid wurde als pKD12 bezeichnet.

Die Nukleotidsequenz der 1,8 kb Insertion wurde bestimmt und ist in SEQ ID NO: 1 wiedergegeben. Durch den Vergleich mit der cDNA-Sequenz und mit der Sequenz wurde das Vorhandensein und die Lage des chromosomalen LAP-Gens ermittelt. Vor dem ATG-Startcodon des LAP-Gens befindet sich ein 581 Nukleotide langer Upstream-Bereich, der als Promotor funktionell ist. Das LAP-Gen weist eine Signalpeptidsequenz von 47 Aminosäuren auf. Das Strukturgen enthält zwei Introns. Hinter dem Stopcodon befinden sich 129 Nukleotide, die als Terminator fungieren können.

#### Beispiel 9

##### Transformationsmethode für *Aspergillus* und *Trichoderma reesei*-Stämme

Von einer ca. zwei Wochen alten Petrischalenkultur des zu transformierenden Pilzstammes wurde eine Sporensuspension in ca. 10 ml 0,85% NaCl durch Abschwemmen unter Zuhilfenahme eines Spatels hergestellt. Es wurden je vier 1 l Schüttelkolben mit 100 ml Czapek-Dox-Minimalmedium (Oxoid) mit 0,1% Hefeextrakt mit je 1 ml Sporensuspension beimpft und ca. 16 Stunden bei 28°C auf einem Rundschtüttler bei 120 Umdrehungen pro Minute inkubiert. Das Mycel aus je vier Schüttelkolben wurde über einem Papierfilter geerntet und mit ca. 50 ml MP-Puffer (1,2 MgSO<sub>4</sub> in 10 mM Phosphatpuffer pH 5,8) gespült. Nach dem Abfließen des Puffers wurde das feuchte Mycel gewogen. In der Regel wurden ca. 3 bis 5 g Feuchtmycel erhalten.

Pro g Feuchtmycel wurden 5 ml MP-Puffer, 120 µl Novozym-Lösung (1 g Novozym® 234 (Novo Nordisk) in 6 ml MP-Puffer), und 25 µl β-Glucuronidase (Sigma) zugegeben. Die Mycel-Suspension wurde 5 min in Eiswasser gestellt. Anschließend wurden 60 µl Rinderserumalbumin-Lösung (0,2 g Rinderserumalbumin in 4 ml MP-Puffer, sterilfiltriert) zugegeben und der Ansatz unter leichtem Schütteln bei 30°C inkubiert. Die Bildung von Protoplasten wurde visuell im Mikroskop verfolgt. Wenn keine wesentliche Zunahme der Protoplastenbildung mehr festgestellt wurde, wurde der Ansatz zur Ernte der Protoplasten abgebrochen. Dies war in der Regel nach etwa 3 bis 5 Stunden der Fall.

Die Protoplastensuspension wurde zur Abtrennung noch vorhandener grober Mycelbestandteile über ein mit MP-Puffer getränktes Glaswollefilter gegeben und in Zentrifugenröhrchen überführt. Die obere Hälfte der Röhrchen wurde mit 600 mM Sorbitol, 100 mM Tris/HCl pH 7,0 überschichtet. Die Röhrchen wurden 10 min bei 2500 g zentrifugiert. Die Protoplasten wurden aus der Zwischenschicht abgenommen und in 1 M Sorbitol, 10 mM Tris/HCl pH 7,5 aufgenommen. Anschließend wurden die Protoplasten zweimal mit STC-Puffer (1 M Sorbitol, 10 mM Tris/HCl pH 7,5, 10 mM CaCl<sub>2</sub>) durch Zentrifugation bei 1500 g gewaschen und zuletzt in 1 ml STC-Puffer aufgenommen.

Zur Transformation von *A. oryzae* oder *A. sojae* wurden 300 µl Protoplastensuspension ca. 10 µg p3SR2 als Selektionsplasmid und 10 µg des jeweiligen Plasmids zur Expression der LAP in 25 µl 10 mM Tris/HCl pH 8,0 zusammengegeben und 10 min bei 0°C inkubiert. Anschließend wurde nochmals 25 µl der gleichen DNA-Menge und 400 µl PEG-Lösung (60% Polyethylenglykol 6000 (Fluka) in 10 mM Tris/HCl pH 7,5, 50 mM CaCl<sub>2</sub>) zusammengegeben, sehr vorsichtig vermischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurden nochmals 600 µl PEG-Lösung zugegeben, vermischt und der Ansatz für weitere 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zu dem Ansatz wurde mit ca. 9 ml Acetamid-Weichagar (Minimalmedium mit 10 mM Acetamid als einziger N-Quelle, 1 M Saccharose, 0,6 Gew.-% Agar) bei 45°C gemischt und auf vier Petrischalen mit dem gleichen Medium, jedoch mit 1,5 Gew.-% Agar (Oxoid) und zusätzlich 15 mM CsCl, verteilt. Die Platten wurden bei 28°C inkubiert. Nach 6 bis 10 Tagen wurden schnell wachsende Kolonien (Transformanten) auf Acetamid-Medium ohne Saccharose isoliert, zweimal über Einzelsporkolonien gereinigt und zuletzt auf Vollmedium, z. B. Kartoffel-Dextrose-Agar übertragen.

Die Transformation von Stämmen der Arten *A. niger*, *A. awamori*, *A. foetidus*, *A. japonicus* oder *A. phoenicis* kann ebenfalls mit dem Plasmid p3SR2 erfolgen. Bevorzugt wurde die Transformation jedoch mit dem Plasmid pAN7-1 ausgeführt. Die Protoplastenpräparation und die Zugabe von Plasmid-DNA erfolgt in analoger Weise wie oben für das Plasmid p3SR2 beschrieben. Statt der Zugabe von Acetamid-Weichagar wird jedoch der gesamte Transformationsansatz zu 100 ml Czapek-Dox-Minimalmedium (Oxoid) mit 100 µg Hygromycin B/ml, 1,5 Gew.-% Agar (Oxoid) und 1 M Saccharose, abgekühlt auf ca. 45 Grad Celsius gegeben und vorsichtig vermischt. Der Ansatz wird dann in Portionen zu je 10 ml in Petrischalen gegeben in denen jeweils 10 ml Czapek-Dox-Minimalmedium (Oxoid) mit 1,5 Gew.-% Agar (Oxoid), jedoch ohne Hygromycin und ohne Saccharose, als feste Unterschicht vorgelegt war. Nach dem Erstarren der oberen Agarschicht werden die Petrischalen bei 37 Grad Celsius inkubiert. Gegen Hygromycin B resistente Transformanten können nach ca. 3–10 Tagen abgeimpft werden und zur Überprüfung der Resistenz auf Czapek-Dox-Minimalmedium (Oxoid) mit 50 µg Hygromycin B/ml und 1,5 Gew.-% Agar (Oxoid) übertragen werden.

# DE 195 26 485 A1

## Beispiel 10

### Herstellung einer LAP sekretierenden Transformante

Der Stamm *A. awamori* NRRL 3112 wurde gemäß Beispiel 9 mit pAN7-1 und pKD12 cotransformiert. Es wurden eine Vielzahl Hygromycin B resistenter Transformanten erhalten und in Schüttelkolben unter Verwendung des im Beispiel 4 angegebenen LAP-Mediums auf Produktion von LAP geprüft. Die Kulturüberstände der Transformante *A. awamori* RH 3827 enthielten in mehreren Versuchen ca. 5000–10 000 LAP-Units/ml. Der Stamm wurde bei der DSM hinterlegt.

### Rekombinant hergestellte Leucinaminopeptidase aus *Aspergillus sojae*

#### Sequenzprotokoll

#### (1) ALLGEMEINE ANGABEN:

##### (i) ANMELDER:

- (A) NAME: Roehm GmbH
- (B) STRASSE: Kirschenallee
- (C) ORT: Darmstadt
- (E) LAND: Germany
- (F) POSTLEITZAHL: D-64293
- (G) TELEFON: (06151)184102
- (H) TELEFAX: (06151)184178
- (I) TELEX: 419 474-0 rd d

##### (ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Leucin-Aminopeptidase aus *A. sojae*

##### (iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 2

##### (iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

# DE 195 26 485 A1

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

### (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LANGE: 1873 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

### (ii) ART DES MOLEKLS: Genom-DNA

### (iii) HYPOTHETISCH: NEIN

### (iv) ANTISENSE: NEIN

### (ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLSSEL: exon
- (B) LAGE:582..1064

### (ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLSSEL: intron
- (B) LAGE:1065..1132

### (ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLSSEL: exon
- (B) LAGE:1133..1450

### (ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLSSEL: intron
- (B) LAGE:1451..1507

### (ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLSSEL: exon
- (B) LAGE:1508..1741

### (ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLSSEL: CDS
- (B) LAGE:join(582..1064, 1133..1450, 1508..1744)

### (ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLSSEL: sig\_peptide
- (B) LAGE:582..722

### (ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLSSEL: mat\_peptide
- (B) LAGE:723..1741

# DE 195 26 485 A1

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

AAGCTTGGCA GGGCGGGTTC CCTACGGACC CCCGGCGGGG AATCCCTGAT GTATCCATGC	60	
TTTCTCATCT GATAGGGTTG GAGACAGTAG ATCTTCATCA CCTCCGATTT CCTTCCTCAA	120	5
GATCCCATGA CTTCAGGTTA CAATGGTCTC TGCAGATACA GCTTACTTCC CGGCATTATA	180	
GGAAGGTCGG AGAGGTGCCA AGTGTGCCA AGCAGCTCCT CATATCTTGC ATCATACTTG	240	
GCCCGGAATA TTCTATGGCG TCAAATGTAA TACACCGTAC CTGCCATGT GACTAATTCG	300	10
CTGGTCTATA AAACCTCGAG TTCTGTCTTT CCATAAAGTG GATCGTTCCC TCATAATCAG	360	
TCTCCCTCGG CTA CTGAGC ATTCCGTTCTG TATCGACTTG GTGATACACG CTTTGTTCG	420	15
CTCAATATGC GTTTCCTCCC CTGCACTCGCG ACCTTGGCAG CCACGGCCTC TGCCCTTGCT	480	
ATTGGAGACC ATATCCGTTT GGACGATCAG TATGTCTTAG AACTTGGCCC GGGAGAAACG	540	
AAAGTTGTIA CGGAAGCAGA GAAATGGGCT CTGAGGGCTG T ATG ACG AAA TTT	593	20
		Met Thr Lys Phe
		-47 -45
CCC TTT GAC GTT TAC GCC CAG CAT CCC GCT AAT AAG ATT GAA CAG GAG	641	
Pro Phe Asp Val Tyr Ala Gln His Pro Ala Asn Lys Ile Glu Gln Glu		25
		-40 -35 -30
GGC AAG CGT TTT TTC GAT ATA ACT GGA CGG ACC AGT AGC CTG GAA CTC	689	
Gly Lys Arg Phe Phe Asp Ile Thr Gly Arg Thr Ser Ser Leu Glu Leu		
		-25 -20 -15
GCA TCG AAC AAG AAG CAA AAA CTC GCG GTC ACC TAT CCC GAT TCC GTG	737	30
Ala Ser Asn Lys Lys Gln Lys Leu Ala Val Thr Tyr Pro Asp Ser Val		
		-10 -5 1 5
CAA CAT AAC GAG ACC GTG CAA AAC CTA ATC AAC TCG CTC GAC AAA AAG	785	35
Gln His Asn Glu Thr Val Gln Asn Leu Ile Asn Ser Leu Asp Lys Lys		
		10 15 20
AAC TTT GAA ACC GTT CTC CAG CCG TTC TCG GAG TTC CAC AAT CGC TAT	833	
Asn Phe Glu Thr Val Leu Gln Pro Phe Ser Glu Phe His Asn Arg Tyr		40
		25 30 35
TAT AAG AGC GAC AAT GGT AAG AAA TCA TCC GAG TGG CTG CAA GGC AAG	881	
Tyr Lys Ser Asp Asn Gly Lys Lys Ser Ser Glu Trp Leu Gln Gly Lys		
		40 45 50
ATT CAG GAA ATC ATC TCC GCC AGT GGA GCA AAG GGA GTC ACT GTG GAG	929	45
Ile Gln Glu Ile Ile Ser Ala Ser Gly Ala Lys Gly Val Thr Val Glu		
		55 60 65
CCT TTC AAA CAC TCC TTC CCG CAG TCG AGT TTG ATT GCG AAG ATC CCC	977	50
Pro Phe Lys His Ser Phe Pro Gln Ser Ser Leu Ile Ala Lys Ile Pro		
		70 75 80 85

55

60

65

# DE 195 26 485 A1

	GGC AAG AGT GAC AAA ACC ATC GTT CTT GGA GCG CAT CAG GAC TCC ATC Gly Lys Ser Asp Lys Thr Ile Val Leu Gly Ala His Gln Asp Ser Ile 90 95 100	1025
5	AAC CTC AAT TCG CCT TCA GAG GGC CGT GCA CCA GGT GCT GGTGGGTACT Asn Leu Asn Ser Pro Ser Glu Gly Arg Ala Pro Gly Ala 105 110	1074
	TCGCACGTCC TGTCCATGAA CCATAGAACA TCGTGATGCT AACAGAGACG CGTGGTTA	1132
10	GAT GAC GAT GGA TCC GGT GTT GTT ACC ATC CTT GAA GCC TTC CGC GTT Asp Asp Asp Gly Ser Gly Val Val Thr Ile Leu Glu Ala Phe Arg Val 115 120 125 130	1180
15	CTC CTG ACG GAC GAG AAG GTT GCG GCC GGT GAG GCT CCG AAC ACC GTT Leu Leu Thr Asp Glu Lys Val Ala Ala Glu Ala Pro Asn Thr Val 135 140 145	1228
20	GAG TTC CAC TTC TAT GCC GGA GAG GAG GGA GGT CTT CTG GGA AGT CAG Glu Phe His Phe Tyr Ala Gly Glu Glu Gly Gly Leu Leu Gly Ser Gln 150 155 160	1276
	GAT ATC TTT GAG CAG TAC TCC CAG AAA AGC CGA GAT GTG AAA GCC ATG Asp Ile Phe Glu Gln Tyr Ser Gln Lys Ser Arg Asp Val Lys Ala Met 165 170 175	1324
25	CTC CAG CAG GAT ATG ACG GGT TAT ACC AAA GGC ACC ACT GAT GCT GGA Leu Gln Gln Asp Met Thr Gly Tyr Thr Lys Gly Thr Thr Asp Ala Gly 180 185 190	1372
30	AAG CCA GAG TCG ATC GGC ATC ATC ACC GAC AAT GTC GAT GAG AAC CTG Lys Pro Glu Ser Ile Gly Ile Ile Thr Asp Asn Val Asp Glu Asn Leu 195 200 205 210	1420
	ACC AAG TTC CTG AAG GTC ATT GTC GAT GCT GTAAGTTTCA AAACCTGTTT Thr Lys Phe Leu Lys Val Ile Val Asp Ala 215 220	1470
35	GTGGTAGTCC CTTTCATGCTT ACACTGGATA CTTGTAG TAT TGC ACT ATC CCG ACC Tyr Cys Thr Ile Pro Thr 225	1525
40	GTC GAT TCG AAA TGC GGA TAC GGA TGC TCT GAC CAT GCT TCT GCC ACG Val Asp Ser Lys Cys Gly Tyr Gly Cys Ser Asp His Ala Ser Ala Thr 230 235 240	1573
45	AAG TAT GGT TAT CCC GCC GCA TTT GCA TTC GAG TCA GCC TTT GGC GAC Lys Tyr Gly Tyr Pro Ala Ala Phe Ala Phe Glu Ser Ala Phe Gly Asp 245 250 255	1621
	GAC AGC CCT TAC ATT CAC TCG GCC GAT GAT ACG ATT GAG ACC GTC AAC Asp Ser Pro Tyr Ile His Ser Ala Asp Asp Thr Ile Glu Thr Val Asn 260 265 270	1669
50	TTT GAC CAT GTG CTG CAA CAC GGC AGA CTG ACT CTT GGA TTT GCA TAT Phe Asp His Val Leu Gln His Gly Arg Leu Thr Leu Gly Phe Ala Tyr 275 280 285 290	1717
55	GAG CTT GCC TTC GCA GAT TCA CTG TAA GGCTTATGAT GACGGTTGTA Glu Leu Ala Phe Ala Asp Ser Leu * 295	1764
	TGAGCGAGAG ATCCAGTCCA ACAGTGTGTA TAATATGTGG GCCTGTGTTT AAATAGCACT	1824
60	TTGATTTAGC CCGCGATTAG CTTTCGTGAC GAAAATAGAG GCCGAATTC	1873
65		

# DE 195 26 485 A1

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 346 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

5

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Met	Thr	Lys	Phe	Pro	Phe	Asp	Val	Tyr	Ala	Gln	His	Pro	Ala	Asn	Lys	10
-47		-45					-40					-35				
Ile	Glu	Gln	Glu	Gly	Lys	Arg	Phe	Phe	Asp	Ile	Thr	Gly	Arg	Thr	Ser	
-30					-25					-20						
Ser	Leu	Glu	Leu	Ala	Ser	Asn	Lys	Lys	Gln	Lys	Leu	Ala	Val	Thr	Tyr	15
-15					-10				-5						1	
Pro	Asp	Ser	Val	Gln	His	Asn	Glu	Thr	Val	Gln	Asn	Leu	Ile	Asn	Ser	
			5					10					15			20
Leu	Asp	Lys	Lys	Asn	Phe	Glu	Thr	Val	Leu	Gln	Pro	Phe	Ser	Glu	Phe	
		20					25					30				
His	Asn	Arg	Tyr	Tyr	Lys	Ser	Asp	Asn	Gly	Lys	Lys	Ser	Ser	Glu	Trp	
	35					40					45					25
Leu	Gln	Gly	Lys	Ile	Gln	Glu	Ile	Ile	Ser	Ala	Ser	Gly	Ala	Lys	Gly	
50					55					60					65	
Val	Thr	Val	Glu	Pro	Phe	Lys	His	Ser	Phe	Pro	Gln	Ser	Ser	Leu	Ile	
				70					75					80		30
Ala	Lys	Ile	Pro	Gly	Lys	Ser	Asp	Lys	Thr	Ile	Val	Leu	Gly	Ala	His	
			85					90					95			
Gln	Asp	Ser	Ile	Asn	Leu	Asn	Ser	Pro	Ser	Glu	Gly	Arg	Ala	Pro	Gly	
		100					105					110				35
Ala	Asp	Asp	Asp	Gly	Ser	Gly	Val	Val	Thr	Ile	Leu	Glu	Ala	Phe	Arg	
	115					120					125					
Val	Leu	Leu	Thr	Asp	Glu	Lys	Val	Ala	Ala	Gly	Glu	Ala	Pro	Asn	Thr	
130					135					140					145	40
Val	Glu	Phe	His	Phe	Tyr	Ala	Gly	Glu	Glu	Gly	Gly	Leu	Leu	Gly	Ser	
				150				155						160		45
Gln	Asp	Ile	Phe	Glu	Gln	Tyr	Ser	Gln	Lys	Ser	Arg	Asp	Val	Lys	Ala	
			165					170					175			
Met	Leu	Gln	Gln	Asp	Met	Thr	Gly	Tyr	Thr	Lys	Gly	Thr	Thr	Asp	Ala	
		180					185					190				50
Gly	Lys	Pro	Glu	Ser	Ile	Gly	Ile	Ile	Thr	Asp	Asn	Val	Asp	Glu	Asn	
	195					200					205					
Leu	Thr	Lys	Phe	Leu	Lys	Val	Ile	Val	Asp	Ala	Tyr	Cys	Thr	Ile	Pro	
																55

60

65



[illegible]

## Patentansprüche

1. Eine rekombinante Desoxyribonukleinsäure (DNA) isolierbar aus *Aspergillus sojae*, dadurch gekennzeichnet, daß sie für eine Leucin-Aminopeptidase (LAP) codiert und eine Nukleotidsequenz entsprechend der in SEQ ID NO: 1 für die reife LAP angegebenen Nukleotidsequenz oder eine davon abgeleitete Nukleotidsequenz, die unter stringenten Bedingungen mit der in SEQ ID NO: 1 für die reife LAP angegebenen Nukleotidsequenz hybridisiert, aufweist.
2. Ein Vektor enthaltend
- a) DNA-Sequenzen zur Replikation des Vektors in *E. coli*
  - b) DNA-Sequenzen zur Expression und Sekretion eines Polypeptids in einem *Aspergillus*-Stamm oder in einem *Trichoderma reesei*-Stamm, die für einen Promotor, eine Signalpeptidsequenz und optional für einen Terminator codieren
  - c) eine für ein Polypeptid codierende DNA-Sequenz, die funktionell mit den DNA-Sequenzen nach b) verbunden ist,
- dadurch gekennzeichnet, daß die DNA-Sequenz nach c) eine Nukleotidsequenz entsprechend der in SEQ ID NO: 1 für die reife LAP angegebenen Nukleotidsequenz oder eine davon abgeleitete Nukleotidsequenz, die unter stringenten Bedingungen mit der in SEQ ID NO: 1 für die reife LAP angegebenen Nukleotidsequenz hybridisiert, aufweist.
3. Vektor nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Vektor ein Plasmid ist.
4. Vektor nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß der Vektor das Plasmid pKD12 ist.
5. Vektor nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Vektor ein Phage oder ein Cosmid ist.
6. Vektor nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die DNA-Sequenzen nach b), die für einen Promotor codieren, ausgewählt sind aus der Gruppe TAKA-Amylase A-Promotor, *gpdA*-Promotor aus *Aspergillus nidulans*, Pektinesterase-Promotor aus *Aspergillus niger*, Polygalakturonidase-Promotor aus *Aspergillus niger*, Glucoamylase-Promotor aus *Aspergillus niger* oder *Aspergillus awamori*, Leucinaminopeptidase-Promotor aus *Aspergillus sojae*, Cellobiohydrolase (*cbhI*)-Promotor aus *Trichoderma reesei*.
7. Vektor nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die DNA-Sequenzen nach b), die für eine Signalpeptidsequenz codieren, die ausgewählt aus der Gruppe TAKA-Amylase A-Signalpeptidsequenz, Pektinesterase-Signalpeptidsequenz aus *Aspergillus niger*, Polygalakturonidase-Signalpeptidsequenz aus *Aspergillus niger*, Glucoamylase-Signalpeptidsequenz aus *Aspergillus niger* oder *Aspergillus awamori*, Leucinaminopeptidase-Signalpeptidsequenz aus *Aspergillus sojae*. Cellobiohydrolase Signalpeptidsequenz (*cbhI*) aus *Trichoderma reesei*.
8. Transformierter Wirtsorganismus geeignet zur Herstellung von Leucinaminopeptidase, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirtsorganismus ein *Aspergillus*-Stamm oder ein *Trichoderma reesei*-Stamm ist und mit einem Vektor nach Anspruch 2 transformiert ist.
9. Transformierter Wirtsorganismus nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirtsorganismus ein Stamm von *Aspergillus niger*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus phoenicis*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus sojae* oder *Trichoderma reesei* ist.
10. Transformierter Wirtsorganismus nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirtsorganismus *Aspergillus sojae* RH3782 ist.
11. Verfahren zur Herstellung von Leucinaminopeptidase durch Fermentations eines transformierten Wirtsorganismus in einem geeigneten zellfreien Kulturfiltrat, dadurch gekennzeichnet, daß der transformierte Wirtsorganismus ein *Aspergillus*-Stamm oder ein *Trichoderma reesei* Stamm ist und mit einem Vektor gemäß Anspruch 2 transformiert ist.
12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß der transformierte Wirtsorganismus ein Stamm von *Aspergillus niger*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus phoenicis*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus sojae* oder *Trichoderma reesei* ist.
13. Verfahren nach Anspruch 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, daß der transformierte Wirtsorganismus eine Transformante von *Aspergillus sojae* RH3782 ist.

14. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß der transformierte Wirtsorganismus *Aspergillus awamori* RH3827 ist.
15. Enzymprodukt, geeignet zur Proteinhydrolyse, dadurch gekennzeichnet, daß es eine mittels eines rekombinanten *Aspergillus*- oder *T. reesei*-Stammes hergestellte Leucinaminopeptidase enthält.
16. Enzymprodukt nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß sich die Leucinaminopeptidase von einer rekombinanten Desoxyribonukleinsäure (DNA) isolierbar aus *Aspergillus sojae*, entsprechend der in SEQ ID NO: 1 für die reife LAP angegebenen Nukleotidsequenz oder einer davon abgeleiteten Nukleotidsequenz, die unter stringenten Bedingungen mit der in SEQ ID NO: 1 für die reife LAP angegebenen Nukleotidsequenz hybridisiert, herleitet.
17. Proteinhydrolysat, dadurch gekennzeichnet, daß es mit einem Enzymprodukt nach Anspruch 15 oder 16 hergestellt wurde.

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

15

20

25

30

35

40

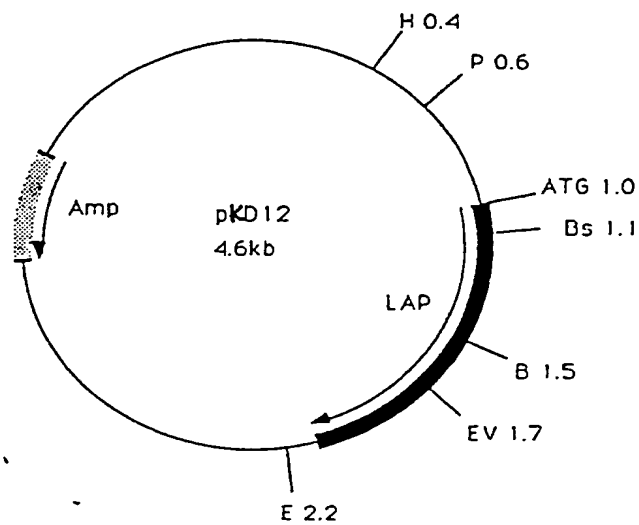
45

50

55

60

65



EV= EcoRV

Bs= BstEII

E. = EcoRI

H. = HindIII

P. = PstI

B. = BamHI

Fig 1: Schematische Darstellung des Vectors pKD12